

成

Prof. **Giulio Tarozi.** — *Ancora sulla cultura aerobica dei germi anaerobici e sulla opportunità di alcune semplificazioni di tecnica.* (Ricerche ed osservazioni).

I.

Dopo che furono pubblicati i risultati delle mie osservazioni sopra alcuni fenomeni relativi alla vita degli anaerobi ed alle loro culture artificiali, e che furono anche indicati dei mezzi di cultura semplici e sicuri, i quali specialmente utili potevano riuscire nell'uso pratico di tali culture, in seguito a nuove osservazioni vennero ultimamente proposte delle modificazioni le quali avrebbero lo scopo principale di agevolarne sempre più l'uso in sostituzione dei metodi anaerobici nei quali, con espedienti varii, sempre di esecuzione più o meno complicata, bisogna provvedere all'allontanamento dell'ossigeno dell'aria dalla presenza della cultura.

In queste ricerche io intesi, oltre che a rendermi obbiettivamente più esatto conto dei reali vantaggi delle proposte modificazioni, anche allo scopo di completare in alcuni dettagli osservazioni già da me fatte, ma sulle quali io avevo dovuto sorvolare nella esposizione forse un po' troppo comprensiva dei precedenti lavori. Di questa occasione poi mi valse per ritornare brevemente, quando se ne presenti il caso, sopra qualche lato almeno delle quistioni relative alle intime ragioni del fenomeno della anaerobiosi batterica, quistioni dalle quali, come si sa purtroppo, per i loro rapporti stretti coi fenomeni così oscuri del ricambio e del chimismo cellulare in genere, si è ben lungi ancora dall'averne strappato l'ultimo velo.

Le modificazioni proposte, alle quali ho accennato, si basano essenzialmente sulla osservazione fatta che in un tubo di brodo comune a cui si sia aggiunto un pezzo di tessuto di organo animale ⁽¹⁾ o di alcuni tuberì vegetali ⁽²⁾, si ottiene lo sviluppo dei germi anaerobici anche se vengono seminati dopo che il mezzo di cultura col tessuto aggiunto sia stato sottoposto a sterilizzazione nell'autoclave a 120 gradi circa, ed anche dopo che un materiale di cultura fatto con polpa di organi sia stato sottoposto per la sterilizzazione per due ore al vapore d'acqua fluente. ⁽³⁾

Realmente per queste osservazioni noi potremmo rendere ancora più semplice e facile di quello che già non sia la preparazione dei mezzi nutritivi per gli anaerobi, mettendoci anche al sicuro da pericoli di inquinamenti che qualche volta si possono verificare quando difettino le precauzioni necessarie nel prelevare i pezzi di organo fresco dall'animale e nel portarli nei tubi di cultura. Però io credo di potere a tale proposito affermare, in seguito ad una non breve esperienza, sia che gli organi interni di animali sani (fegato, reni, milza) si devono considerare come normalmente privi di germi, sia che il prelevamento aseptico di pezzi di tali organi è sempre di facile esecuzione e che facilissimo poi è l'accertarci prima di adoperare i mezzi così preparati per le culture, se questi siano realmente sterili.

La predetta osservazione inoltre ci poteva però anche interessare dal punto di vista puramente teorico, poichè essa poteva prestarsi ad apprezzamenti sulla natura delle cause che influiscono determinando la azione favorente lo sviluppo dei germi o sulla eventuale presenza nei tessuti di sostanze diffusibili favorenti, che in tale caso avrebbero dovuto avere anche la proprietà di resistere al calore, come fu difatti asserito; apprezzamenti i quali avrebbero potuto deviarci da quei concetti che primitivamente su di tali cause ci eravamo formati, e che, come meglio ho potuto, ho cercato di svolgere e di delucidare in precedenti lavori.

Era del resto già stato osservato ⁽⁴⁾ come i germi anaerobici

(1) Bandini. — Ricerche sulla coltivazione degli anaerobi. Giorn. R. Acc. med. di Torino, 1. giugno 1906.

(2) Wrzosek Beobach. ü. d. Beding. d. Wachstums d. oblig. Anaë in aërober Weise Centbl. f. Bakt. B. XLIII. H. 1. 1906.

(3) Harras. — Zur Frage d. aëroben Züchtung sogen. oblig. anaër. Bakterien. Munch. Med. Woch. n. 46. 1906.

(4) Ulteriori osserv. sulla cultura aerob. d. germi anaerobici. Atti Accadem. fisioer. Siena. Vol. XVII 1905.

potessero rigogliosamente svilupparsi aerobicamente anche in un tubo di brodo nel quale si fosse lasciato il precipitato albuminoso che si forma dall'estratto acquoso della carne colla sterilizzazione, alla condizione però, si notava, che non fosse stata troppo elevata la temperatura o troppo lunga la durata della sterilizzazione. A tale proposito era stato pure notato come questi brodi col precipitato albuminoso si mantenessero adatti per lo sviluppo dei germi anaerobici per un periodo di tempo breve che non oltrepassava mai un limitato numero di giorni. Tutti i germi anaerobici da me provati potevano sviluppare bene aerobicamente in tali mezzi culturali, eccettochè il bacillo del tetano. Ora a me non sembra debba supporre esistere dal punto di vista della coltivabilità in essi dei germi, una sostanziale differenza fra le qualità del substrato in cui rimanga ciò che precipita dall'estratto acquoso del tessuto dopo la sterilizzazione, e quelle del substrato in cui il tessuto vi sia posto in sostanza prima della sterilizzazione.

È anche vero però che io in altro luogo asserivo (1) come bastasse sottoporre ad ebullizione a bagno-maria anche per soli 5 minuti un tubo di brodo a cui si fosse aggiunto un frammento di tessuto fresco, perchè tale brodo perdesse della proprietà di dare sviluppo aerobico ai germi anaerobici. Convengo che questa affermazione messa in termini così assoluti può non corrispondere ai fatti che si possono verificare invece sperimentando con molte specie di germi anaerobici.

Ma ne è ragione che io nelle prime ricerche adoperavo nel fare queste prove il b. del tetano ed uno pseudotetanico isolato dall'intestino del cane, i quali germi hanno un potere di adattabilità a tali substrati inferiore a quello di altri germi; ed in ricerche ulteriori (2) avendo osservato che nella serie dei germi anaerobici di cui disponevo si notavano differenze molto estese nel grado di adattabilità a svilupparsi aerobicamente, per cui ad es. il *b. carnis saprogenes*, il *b. d. Bradsot*, ed il *Clostridium carnis foetidum*, fra quelli da me provati, potevano costantemente svilupparsi abbastanza bene e sporificare anche in tubi di brodo comune di recente preparato e senza glucosio, mentre invece altri germi, come ad es. il b. del tetano, si mostravano renitenti a questi adattamenti, per cui potevano dare appena un accenno di

(1) Sulla biologia di alcuni germi anaerob. ecc. Riforma medica. Anno XXI n. 6-7-8, 1905.

(2) Ulteriori osservazioni ecc. l. c.

sviluppo nei brodi contenenti il precipitato albuminoso e sterilizzati a basse temperature di autoclave, nel quale mezzo pure tutti gli altri germi davano invece culture rigogliose, per queste considerazioni io mi volevo generalmente e preferibilmente, quando volevo provare come si fosse modificato il substrato per rispetto alla sua attitudine o meno a permettere lo sviluppo aerobico dei germi anaerobici, di questi ultimi germi. Ed io credo probabile che molti degli apprezzamenti fatti dallo Wrzosek non sarebbero forse stati così recisi se nelle sue ulteriori ricerche (1), invece di valersi soltanto del *b. del carbonchio sintomatico, del vibrione settico e del batulino*, avesse continuato a sperimentare anche col *b. del tetano*, che invece abbandonò dopo le sue prime ricerche sulla cultura aerobica dei germi anaerobici (2). Ed è invece per questa ragione che nel proporre metodi per la cultura dei germi anaerobici io mi sono attenuto con più insistenza a quello che avevo giudicato, per quanto si riferisce alla sicurezza di buona riuscita, estensibile a tutte le specie degli anaerobi sui quali lo avevo provato, senza presentare per alcun germe nè eccezioni nè differenze di rilievo.

Prima di esporre i risultati di queste osservazioni farò precedere qualche avvertenza relativamente ad alcune norme a cui è bene attenerci in questo genere di ricerche onde si possano avere dei dati il più possibilmente fra loro paragonabili.

Poichè, come vedremo anche nel seguito di queste ricerche, è sempre molto notevole la influenza dell'ossigeno dell'aria che viene a contatto del mezzo di cultura determinandovi delle modificazioni che spesso sono intense e relativamente rapide, specialmente agendo sopra dei mezzi che siano stati sterilizzati; e poichè, come è facile comprendere, tale influenza dovrà esercitarsi in modo maggiore o minore in rapporto con la ampiezza della superficie di contatto del liquido di cultura con l'aria, e con la altezza dello strato del liquido contenuto nei tubi, è bene avere per norma di adoperare tubi di cultura sempre della stessa grandezza e preferibilmente di diametro non molto ampio e di porre nei tubi stessi sempre la stessa quantità misurata di liquido. Inoltre, poichè la durata del tempo che i substrati permangono sotto l'azione del calore, ha pure una non indifferente influenza sopra modificazioni che si compiono nel substrato per la azione medesima del calore,

(1) Wrzosek. l. c.

(2) Wrzosek. Ueber das Wachstum oblig. anaër auf kulturmitteln in aërober Weise. Wiener klin. Woch. XVIII n. 48 1905.

sarà bene usare sempre di uno stesso autoclave ed introdurvi il materiale da sterilizzarsi quando sia già avviata la ebullizione adoperando preferibilmente un autoclave che salga rapidamente alla temperatura voluta.

Il brodo era preparato con infuso di carne e peptone; la precipitazione delle albumine facevo in autoclave a circa 120° per 10 minuti.

Quando occorreva fare culture anaerobiche mi valevo del metodo del pirogallato potassico, versando le due soluzioni sul tappo di cotone che poi affondavo, e chiudevo ermeticamente la provetta con tappo di gomma o con disco di sughero e paraffina.

La tecnica usata ed i metodi seguiti in queste ricerche furono gli stessi di cui mi valse in precedenti ricerche (1).

Sui fatti osservati farò poi via via seguire qualche considerazione relativamente al modo possibile di interpretarli.

Ho ripetuto prima le culture dei germi anaerobici in brodi con tessuto animale e sterilizzati in autoclave.

In una serie di tubi di brodo comune esattamente neutralizzato si aggiunge per ciascun tubo un pezzo di fegato di coniglio del volume approssimativo di circa 1 cc. e si sterilizzano in autoclave per 15' a 120°.

In uno dei tubi si aggiunge prima della sterilizzazione una goccia di una soluzione di bleu di metile all'1 ‰. Tolti dall'autoclave, e dopo raffreddamento, si semina in due tubi il b. del tetano, in due il vibrione settico, in due il carbonchio sintomatico e si pongono in termostato.

Esaminati dopo 24 ore sono uniformemente intorbidati i tubi seminati col carbonchio sintomatico e col vibrione settico; rimangono limpidi quelli seminati col tetano.

L'esame microscopico in goccia pendente fatto dopo due giorni di incubazione in termostato dimostra buono sviluppo ed anche buona sporificazione per il carbonchio sintomatico e per il vibrione settico.

Le albumine diffusesi dal tessuto e che si erano coagulate col calore si sono interamente disciolte in seguito allo sviluppo dei germi.

I tubi seminati col tetano rimasero anche dopo due giorni

(1) Osservaz. sulla natura dei fenomeni, ecc. Atti della R. Acc. dei fisiocritici, vol. XVII, Siena 1905.

limpidi, e solo coll'esame in goccia pendente si vedeva in uno di essi qualche rara forma bacillare e nessuna spora.

Il tubo a cui si era aggiunto una goccia di soluzione di bleu di metile quando si toglie dall'autoclave è perfettamente incoloro. Raffreddandosi al contatto dell'aria si ricolora gradatamente dagli strati superiori verso gli inferiori, e dopo uno spazio di tempo relativamente breve fra due-tre ore tutta la massa del liquido ha ripreso il colore azzurro. Portato allora in termostato si scolorisce di nuovo negli strati profondi, ma già dopo un tempo non lungo fra 6-8 ore ha interamente ripreso il colore azzurro. Questo fatto ci indica che le ossidazioni che si continuano nel brodo a reazione neutra e sterilizzato con un pezzo di tessuto sono poco intense se si confrontano con quanto avviene in un tubo pure di brodo neutro ma con tessuto fresco e sterile, nel quale, come già altra volta vedemmo, la scolorazione al di sotto degli strati superficiali che si manifesta in termostato, permane lungamente. Però anche in questi tubi con tessuti sterilizzati, lenti e deboli processi ossidativi si continuano anche dopo che il brodo ha ripreso interamente il colore azzurro, perchè se vengono chiusi anaerobicamente, in un tempo vario, ma non mai lungo oltre qualche giorno, si decolorano di nuovo completamente. Questo debole potere riducente che spiega il tessuto sterilizzato in reazione neutra del brodo può essere ragione a dubitare che soltanto ad esso debba attribuirsi il buono sviluppo delle culture in questi substrati, ma invece che altre condizioni favorevoli vi possano concorrere, e noi vedremo più avanti come questo possa anche essere il caso e come si possano spiegare questi fatti.

Se invece di sterilizzare in autoclave dei tubi di brodo con frammenti di fegato, si tengono in ebullizione a bagno-maria per 15', e dopo raffreddamento vi si seminano i predetti germi anaerobici, ad un dipresso si ottengono risultati analoghi, senonchè, come nei tubi riscaldati in autoclave vi fece difetto lo sviluppo del b. del tetano, in questo caso vi fece pure difetto lo sviluppo del carbonchio sintomatico che si arrestò alle forme vegetative o si ebbe sporificazione molto misera e stentata.

Onde da queste prime osservazioni risulterebbe che effettivamente in tubi di brodo neutro a cui sia stato aggiunto un frammento di un organo parenchimale come il fegato, e poi siano stati sterilizzati in autoclave a 120°, se si seminano dopo raffreddamento i germi anaerobici, questi normalmente vi si possono sviluppare in cultura sufficientemente rigogliosa ed evoluta; ma che però al-

cuni germi, come ad esempio il tetano, o non vi si sviluppano, od in modo insufficiente. Ho provato a coltivare in mezzi così preparati anche altri germi anaerobici sporificanti, e ne ho pure ottenuto risultati positivi, per cui è da ritenersi probabile che essi possano servire ad ottenere culture per il maggior numero delle specie più note dei germi anaerobici.

Quanto alla durata del tempo in cui tali tubi possono mantenere la facoltà di permettere lo sviluppo aerobico dei germi anaerobici, si osserva che tale facoltà svanisce entro un periodo di giorni molto vario e relativamente breve, oscillante fra 5-10 od anche 12 giorni, ed in ogni caso assai prima che nei tubi con tessuto crudo. Si verifica in ciò lo stesso fatto già notato a proposito dei tubi di brodo contenenti il coagulo albuminoso precipitato dall'estratto di carne. Lo sviluppo è però sempre più difettoso quanto più ci si allontana dal tempo della sterilizzazione.

Vediamo ora come potremmo spiegarci la azione favorente del tessuto aggiunto al brodo prima della sterilizzazione.

Dobbiamo perciò prima provare come si comporta lo sviluppo dei germi in presenza di tessuti sterilizzati non più in tubi di brodo ma contenenti semplicemente acqua cloruro-sodica.

In altro luogo già facemmo rilevare come le culture fatte in tubi contenenti acqua ed un frammento di organo parenchimale allo stato fresco, riuscissero positive per tutti i germi, sviluppandosi prontamente e rigogliosamente come nei tubi contenenti invece del brodo. Nuove prove ora ripetute riconfermano queste osservazioni. Il tetano soltanto difetta qualche volta nella sporificazione, ma produce abbondante gas, scomposizione putrida dei tessuti e tossina molto attiva.

Si prepara anche per questa esperienza una serie di tubi contenenti ciascuna 5 cc. di acqua cloruro sodico, e vi si aggiunge un pezzo di fegato di coniglio come nei precedenti. In un tubo è stata messa una goccia di soluzione di bleu di metile. Dopo sterilizzazione per 15' a 120° e raffreddamento, si seminano in coppie di tali tubi il tetano, il carbonchio sintomatico, il vibrione settico.

Osservate le culture dopo due giorni di termostato il liquido si mostra nei vari tubi ancora completamente limpido: In alcuni il coagulo albuminoso formatosi colla sterilizzazione è divenuto negli strati più profondi leggermente roseo, fenomeno che, come altrove vedemmo, ⁽¹⁾ deve probabilmente collegarsi ad un principio

(1) l. c.

di disossidazione che si esplica sulla sostanza colorante del sangue precipitata col coagulo.

Con l'esame microscopico si vede in questi tubi qualche raro bacillo, e nessuna traccia di sporificazione.

Si fa un'altra prova con gli stessi germi seminati in tubi preparati come i precedenti, e questa volta sviluppano discretamente le culture del vibrione settico, formandosi anche qualche spora, ma in numero però molto scarso. Le culture del tetano e del carbonchio sintomatico rimangono sterili.

Nel tubo a cui si era aggiunta una goccia di bleu di metile si nota un comportamento analogo a quello della serie precedente. La colorazione, che era completamente scomparsa quando si tolse il tubo dall'autoclave, riapparve, col raffreddarsi del liquido ed in poche ore si diffuse a tutta la massa liquida. Nel termostato si scolorì ancora nelle parti profonde, e dopo poco meno di 24 ore si era ricolorito completamente.

Analizziamo ora e confrontiamo fra loro i fatti osservati in queste due serie di esperienze cercando quale interpretazione vi possiamo dare.

Intanto, per il fatto che si hanno risultati negativi od incostanti e sempre deficienti nello sviluppo nei tubi contenenti tessuto ed acqua cloruro sodica e sterilizzati in autoclave, mentre invece si ottengono sempre risultati positivi in quelli pure con tessuto, ma che non furono sottoposti all'azione del calore, mi pare che, ammessa pure l'ipotesi della presenza di una sostanza sconosciuta e favorente lo sviluppo degli anaerobici, tale sostanza non dovrebbe ritenersi affatto indifferente all'azione del calore. È vero che si potrebbe obiettare che, precipitando col calore la massima parte delle sostanze albuminose contenute nel liquido, i germi non vi si sviluppano più per insufficienza di sostanze nutritive disciolte e quindi utilizzabili, mentre invece potrebbe trovarsi ancora presente la pretesa sostanza favorente la quale, per le predette condizioni improprie del substrato, riesce inutile, mentre agirebbe provocando lo sviluppo dei germi se nel liquido culturale fossero presenti le sostanze nutritive che si trovano nel brodo-peptone, o quelle diffusesi dal tessuto in macerazione.

Ma si può contrapporre che se proprio lo sviluppo dovesse attribuirsi solo alla presenza di una sostanza favorente speciale emanata dal tessuto e resistente al calore, e questo tanto per le culture in brodo cui sia stato aggiunto un frammento di organo fresco, come per quelle fatte in brodo e tessuto insieme sterilizzati

in autoclave, male si arriverebbe a spiegarci perchè tale sostanza dopo sterilizzazione, non favorisse più affatto o con molto minore efficacia lo sviluppo del tetano, ad es., al pari di molte altre specie di anaerobi; e così pure male si comprenderebbe perchè nelle culture fatte in tubi contenenti acqua e tessuti sterilizzati in autoclave, si abbiano bensì in generale risultati negativi, ma fra questi tuttavia si possono non raramente avere, e più specialmente per determinati germi, ad es. il vibrione settico, dei risultati positivi, per quanto a sviluppo sempre povero e difettoso.

Ma noi dobbiamo d'altra parte considerare che se nei tubi contenenti acqua e tessuti sterilizzati in autoclave, seminati dopo la sterilizzazione, nella generalità dei casi non si ha sviluppo dei germi anaerobici, appunto per questo potrebbe parer logico ammettere che il tessuto aggiunto e sterilizzato col brodo vi dovesse invece soltanto spiegare una azione favorente sullo sviluppo dei germi nel brodo. Per cui l'ipotesi da qualcuno emessa della probabile esistenza di una o diverse sostanze favorenti che emanino dal tessuto aggiunto e che resistano alla temperatura di sterilizzazione in autoclave, potrebbe per questi casi parere giustificata.

Si osservi però ancora a questo proposito che se ai tubi contenenti acqua e tessuto sterilizzati in autoclave, e rimasti sterili dopo uno o due giorni di permanenza in termostato, noi aggiungiamo del brodo sterile, non per questo si vede progredire lo sviluppo, ed anche aggiungendo brodo ad uguali tubi che siano rimasti invece che nella stufa, all'ambiente, non se ne migliorano le condizioni. Onde una certa influenza pare che anche vi eserciti il fatto di trovarsi il brodo ed il tessuto a contatto fra loro durante il tempo del riscaldamento in autoclave.

Io credo che la ragione di questi apparenti contrasti stia nel fatto che la parte che prende nel favorire lo sviluppo dei germi il tessuto aggiunto al brodo nel caso che si lasci al suo stato naturale e nel caso invece che venga sottoposto a sterilizzazione nell'autoclave, sia diversa. Nella prima condizione si deve ritenere, come già altre volte ebbi occasione di dire, che siano le sostanze albuminose stesse costituenti il tessuto e che si diffondono con altre sostanze da questo nel liquido di cultura, quelle che rappresentano gran parte del pabulum opportuno per i germi anaerobici, indipendentemente da qualsiasi influenza di azioni favorenti, per cui il tessuto da solo può costituire un substrato opportuno al rigoglioso sviluppo dei germi. Le culture difatti su tessuto non cotto vengono bene e spesso meglio che nel brodo, nel fondo di

un tubo di agar inclinato, e quindi a maggior contatto coll'aria; ma le culture con tessuto sterilizzati è necessario invece siano fatte in tubi di brodo. Nella seconda condizione invece, il tessuto aggiunto spiega la sua azione favorente non più costituendosi per sè stesso come alimento naturale dei germi, ma invece agendo, in gran parte almeno, come un mezzo riduttore mediante le sue sostanze facilmente ossidabili, e che agevola la dislocazione dell'ossigeno fissatosi nelle sostanze albuminose disciolte nel brodo, sostituendosi così in certo modo alla azione favorente che esercita sulle culture anaerobiche la diminuita tensione dell'ossigeno atmosferico. E tanto più plausibile ci apparirà questa interpretazione se noi paragoniamo i fatti che si osservano nelle culture in brodo con tessuto sterilizzato, con quelli, per tanti lati analoghi, che si osservano nelle culture in brodo nelle quali come riduttore si faccia agire il glucosio, e di cui la tecnica di preparazione ho esposto in altro luogo. Noi vedremo ancora più avanti gli stessi fatti riprodursi a proposito delle culture fatte in brodo contenente un tessuto vegetale e sterilizzato.

E questa differenza nel modo di agire favorendo lo sviluppo dei germi fra il tessuto sterilizzato col brodo, e quello invece che sia aggiunto al brodo sterilmente ed allo stato crudo, ci apparirà ancora dal fatto che le culture in questo secondo caso crescono bene, per quanto più lentamente, anche a temperature inferiori a quelle del termostato, e come si hanno nell'ambiente, determinando la scomposizione putrida dei tessuti, come avviene nei comuni processi putrefattivi; mentre nel primo caso esse riescono solo in termostato, dove le ossidazioni e conseguenti disossidazioni fra le sostanze contenute nel mezzo culturale sono notevolmente agevolate dalla più elevata temperatura.

E se nei tubi di brodo a cui sia stato aggiunto un pezzo di organo in sostanza e poi sterilizzati, noi vediamo la facoltà di permettere aerobicamente lo sviluppo dei germi anaerobici resistere a temperature più alte di autoclave e durare in tale facoltà anche più a lungo che i tubi di brodo-peptone nei quali si sia lasciato il coagulo albuminoso precipitatosi col calore dell'estratto acquoso di carne, ciò io credo si possa mettere in rapporto col fatto che nell'interno del tessuto reso anche più compatto dall'azione coagulante del calore, i fenomeni di ossidazione avvengono con più difficoltà e più lentamente che sopra le sostanze disciolte dall'infuso di carne; e quelle sostanze ancora riducenti, e quindi favorenti sullo sviluppo, in esso contenute, lentamente diffondendosi nell'am-

biente liquido, spiegano per più lungo tempo la loro azione sul mezzo culturale. E queste differenze fra i brodi preparati in questi due diversi modi, sono pure esse in opposizione, mi sembra, coll'ipotesi che si tratti di una qualsiasi sostanza emanata dal tessuto stesso, e resistente al calore, e che spieghi la sua azione favorente in un modo diverso da quello che sopra si è detto, poichè non si vorrà ammettere, ripeto, che possano esistere delle differenze sostanziali in riguardo alla presenza di sostanze che possano venire in causa nel determinare questi fenomeni, fra la composizione del liquido spremuto da un infuso di tessuto di organo finalmente triturato, ed un pezzo di questo stesso tessuto.

Si può invece osservare il fatto, in apparenza strano, che nelle culture in brodo contenenti il precipitato albuminoso, lo sviluppo, che da principio era mancato interamente o si era appena manifestato con la presenza nel liquido di qualche rara forma vegetativa, dopo un periodo di tempo vario fra 3-4 giorni di termostato ed anche qualche volta dopo un periodo più lungo, se vengono messi di nuovo alla temperatura dell'ambiente, ed osservate dopo un tempo indeterminato di diversi giorni, lo sviluppo, ripeto, ricominci, ed il brodo si intorbidì e proceda abbastanza bene fino alla sporificazione. Ritornerò fra breve sulla interpretazione di questo fatto dopo avere esposto il risultato di una prova fatta coltivando i germi in tubi di brodo nei quali si era pure lasciato il precipitato albuminoso, ma che invece di essere preparati con infuso di carne furono preparati con infuso di fegato di coniglio. In questo modo io mi sono avvicinato quanto più era possibile alle condizioni delle culture nelle quali era stato posto a sterilizzare col brodo un frammento in sostanza dello stesso organo.

Una pesata quantità di fegato di coniglio viene sminuzzato e triturato in un mortaio. Vi si aggiunge doppio peso d'acqua e si lascia macerare per 24 ore in luogo fresco.

L'infuso poi si filtra su panno e se ne sprema il residuo. Si aggiunge il peptone e cloruro sodico nelle solite proporzioni e si sterilizza in autoclave per 15' a 120°. La reazione è di per sé già debolmente alcalina e quindi non occorre neutralizzazione. Siccome il coagulo che si forma nella boccia è in questo caso soffice ed unito, vengono introdotti nella boccia stessa, insieme al liquido prima della sterilizzazione dei frammenti di vetro che servono poi, agitando, a rompere il coagulo.

Si aspira poi con una grossa pipetta di vetro sterilizzata, a largo foro, dal fondo della boccetta, liquido e precipitato, e si distribuisce in provette pure sterili.

Un residuo del liquido si filtra, ed il filtrato si distribuisce pure in provette, e queste si sterilizzano di nuovo in autoclave.

Dei tubi contenenti brodo e precipitato albuminoso se ne seminano 4 con tetano, 4 con carbonchio sintomatico, 4 con vibrione settico.

Due per ciascun germe si chiudono anaerobicamente, due si lasciano in comunicazione coll'aria e chiusi solo col tappo di cotone. Uno dei tubi con precipitato, non seminato, si colora con una goccia di soluzione di bleu di metile pure sterile.

Dei tubi contenenti il brodo filtrato se ne seminano pure 4 per ogni germe di cui due nello stesso modo si chiudono anaerobicamente, e due si lasciano in comunicazione coll'aria.

Tutti questi tubi seminati si pongono poi in termostato, e con essi alcuni anche dei tubi con precipitato albuminoso, ma che non furono seminati con alcun germe.

Osservati dopo un giorno di termostato tutti i tubi chiusi anaerobicamente si sono intorbidati uniformemente ed il coagulo albuminoso si è in parte sciolto ed ha assunto un colore scuro-rosastro.

In quelli lasciati in comunicazione coll'aria non si ha dopo questo tempo ancora accenno di sviluppo, ed il coagulo si mantiene inalterato.

Il tubo che era stato colorito col bleu di metile, dopo qualche ora di stufa è scolorito fino circa alla metà dell'altezza del liquido e così permane per circa un giorno. La colorazione dopo si estende lentamente verso il basso fino a raggiungere il fondo del tubo verso la fine del secondo giorno. Ciò che dimostra che in seno al liquido si compiono in questo tempo delle abbastanza attive ossidazioni.

Osservati dopo due giorni di termostato i tubi di brodo filtrato ed in comunicazione coll'aria non dimostravano alcun segno di sviluppo. Di quelli contenenti il brodo col precipitato albuminoso, alcuni di quelli seminati col carbonchio sintomatico e col vibrione settico erano lievemente intorbidati, altri ancora inalterati. Quelli seminati col tetano si erano conservati anch'essi tutti apparentemente inalterati.

L'esame in goccia pendente dimostrò in tutti i tubi contenenti il precipitato la presenza di forme vegetative sempre poco abbondanti. Nei tubi di tetano erano molto rare, e più abbondanti invece che in tutti gli altri, nei tubi seminati col vibrione settico.

Nei giorni seguenti, lo sviluppo progredisce nei tubi seminati

col vibrione settico e carbonchio sintomatico nei quali si arriva fino ad una sufficiente sporificazione ed il precipitato più o meno completamente si dissolve. I tubi di tetano rimangono però tutti nelle stesse condizioni.

L'altra serie di tubi che era stata posta insieme alle prime in termostato, ma sterile, viene dopo tre giorni di permanenza in termostato parimenti seminata coi tre predetti germi, e nello stesso modo 4 tubi per ogni germe, di cui due si chiudono anaerobicamente, due si lasciano in comunicazione coll'aria.

Esaminati dopo due giorni di termostato, quelli chiusi anaerobicamente si sono tutti intorbidati; quelli lasciati in comunicazione coll'aria non danno segno di sviluppo ad eccezione di uno dei tubi seminati col carbonchio sintomatico nel quale si ha leggero intorbidamento, ma non formazione di spore.

Se prendiamo in esame i risultati di questa esperienza constatiamo anzitutto che essi si avvicinano molto a quelli che si ottennero nei tubi di brodo a cui era stato aggiunto un pezzetto di fegato fresco e poi sterilizzato nell'autoclave. Vi si notano tuttavia alcune differenze, poichè, ad es., la insufficienza di questi mezzi per la cultura del tetano è anche più pronunziata che nei tubi sterilizzati con tessuto; e per gli altri germi si ebbe bensì sviluppo, ma questo apparve notevolmente in ritardo, almeno per quanto poteva rilevarsi macroscopicamente dall'aspetto esterno del liquido di cultura. Sopra alcuni dei fatti osservati dobbiamo un po' soffermarci.

Strano intanto ci può apparire il fatto, che ha riscontro con quello a cui più sopra accennammo per le culture in brodo di carne con precipitato albuminoso, che lo sviluppo si mantenesse lentissimo ed esternamente inapprezzabile nel primo e secondo giorno, quando invece le azioni riducenti si mostravano nel mezzo più attive, per cui il tubo di brodo colorito col bleu di metile rimaneva per buona parte scolorito, mentre invece più tardi, quando già il tubo colorito aveva quasi interamente ripreso il suo colore, lo sviluppo si svolgeva nei tubi seminati, più intensamente.

Così pure ci si può presentare come strano l'altro fatto osservato, che i tubi contenenti il brodo col precipitato albuminoso e che furono seminati dopo tre giorni di permanenza in termostato rimanessero sterili, mentre in quelli seminati poche ore dopo la preparazione del brodo e parimenti lasciati in termostato, appunto verso tale epoca lo sviluppo si faceva manifesto e più intensivo.

Già vedemmo, come tutti i tubi seminati nelle condizioni dei

precedenti e chiusi anaerobicamente dessero sviluppo pronto e rigoglioso.

A me sembra però non sia difficile interpretare questi diversi fatti se noi analizziamo e teniamo conto da una parte di alcune condizioni speciali di questi substrati nel momento in cui vennero seminati; e dall'altra delle influenze modificatrici che per conto proprio i germi sono capaci di esercitare sul substrato nell'esplinarsi della loro attività biologica.

Per le prime possiamo subito rilevare come il tessuto, dopo che fu sterilizzato nell'autoclave, non assorba ossigeno dall'ambiente così attivamente come quando si trova allo stato crudo. Difatti i tubi contenenti brodo e tessuto e che siano stati coloriti col bleu di metile, quando si tolgano dall'autoclave, dove, nonostante l'alta temperatura, il tessuto non può fissare molto ossigeno poichè nell'ambiente non se ne trova, o pochissimi resti, essi sono bensì interamente scoloriti, ma ben presto, e spesso già appena che si sono raffreddati, hanno di nuovo ripreso interamente il colore bleu; e se si pongono allora in termostato si scolorano di nuovo nelle parti profonde, ma tale scolorazione non dura in generale nei tubi sterili oltre un giorno. I tubi con tessuto crudo invece durano scoloriti in termostato al disotto degli strati superficiali, per diversi giorni, e se si fa diffondere il colore agitandoli e poi si ripongono in termostato, in breve di nuovo si decolorano.

Ci sembra quindi già per queste semplici constatazioni da ritenersi probabile che le sostanze albuminose costituenti il tessuto e che, specialmente nei primi tempi dopo che furono tolte dall'animale ed esposte all'aria, fissano attivamente ossigeno, nel passare dallo stato di soluzione o di intima compenetrazione di liquido, come si trovano nel brodo, allo stato solido per effetto della coagulazione, perdano della loro attitudine a fissare ossigeno, attitudine, che, però, come vedremo, possono riacquistare se ridisciolte. Ed una parte almeno del potere riducente che si osserva nel brodo in questi casi nei primi tempi dopo la sterilizzazione, è ancora probabile sia dovuta alla influenza di altre sostanze ossidabili diffesi nel liquido dal tessuto, influenza che ben presto si esaurisce al contatto dell'ossigeno atmosferico.

Deve però ritenersi che anche le sostanze albuminose precipitate col calore continuo per conto proprio lentamente a fissare ossigeno sottraendolo dall'ambiente; ed io ho cercato in altro luogo

di darne una dimostrazione (1). Il Bandini (2) avrebbe visto che le albumine dei tessuti coagulate dal calore e poi disseccate in stufa, ed anche dopo che avessero subito una temperatura a secco di 150° per un'ora, conserverebbero il potere di dare sviluppo ai germi anaerobici se aggiunte al brodo; e ridisciolte nel brodo e poste in termostato esse avrebbero ancora dimostrato un attivo potere di fissare ossigeno, come il tessuto morto ed al suo stato naturale; ciò che dimostrerebbe appunto quanto sopra fu detto che passando allo stato solido non si erano saturate di ossigeno. Opportuno sarebbe stato in questo caso osservare come si comportavano per rispetto allo sviluppo dei germi anaerobici, se, invece di venire disciolte nel brodo, lo fossero state, ed in quantità sufficiente, in tubi contenenti semplicemente acqua. Ma dopo un certo tempo non lungo di permanenza all'aria queste soluzioni in brodo non si prestavano più allo sviluppo aerobico dei germi anaerobici; e se allora il dottor Bandini avesse anche saggiato il potere riducente di tali soluzioni, lo avrebbe certamente trovato scomparso o non più rilevabile in tubi aperti (3). Onde, per quanto fin qui fu detto, sembrerebbe se ne potesse inferire che le sostanze albuminose estratte dai tessuti freschi e coagulate col calore possano ancora costituire per sè stesse un nutrimento idoneo alla assimilazione dei germi anaerobici, ma che possono invece difficilmente venire utilizzate perchè si trovano allo stato solido e non solubili.

Per parte poi dei germi noi sappiamo che nello svolgersi delle loro attività vitali essi sono capaci di indurre in grado vario sulle sostanze del mezzo nutritivo dei fatti di disossidazione e dei fatti di dissoluzione sulle sostanze albuminose coagulate. Orbene, se dei germi dotati in un grado più elevato di tali facoltà di adattamento, come sembrano essere, ad es., il carbonchio sintomatico, ed anche meglio il vibrione settico in confronto, ad es., del b. del tetano, possono trovare disciolte nel mezzo di cultura anche delle minime

(1) Ulteriori osservaz. sulla cultura aerobica degli anaerobi. Atti R. Acc. Fisiocr. XVII, 1905, Siena.

(2) l. c.

(3) Il dottor Bandini in un'altra esperienza mette ad essicare a 37° l'estratto acquoso di fegato, crudo e preparato nelle stesse proporzioni d'acqua che si usano per il brodo comune di carne. Ma non ci dice del tempo impiegato per la completa essiccazione onde poterne polverizzare il residuo nè come si difese dalla putrefazione ed inquinamenti. Fu già detto più volte e confermato da Ori e da altri che il protrato contatto dell'aria toglie il potere di dare sviluppo agli anaerobi anche ad un frammento di fegato messo in un tubo di brodo. Tanto più presto poi questo potere scompare se si mantiene a temperatura di termostato.

quantità di sostanze da loro utilizzabili, ma che siano sufficienti perchè essi possano dapprincipio lentamente e poveramente iniziare il loro sviluppo, contemporaneamente a questo si inizieranno le predette azioni trasformative sulle sostanze contenute nel liquido di cultura, e lo sviluppo potrà in seguito svolgersi in modo più rigoglioso. Ma quei germi invece, alla categoria dei quali sembra appunto appartenere il b. del tetano, che non posseggono le predette facoltà, od almeno in grado insufficiente alle esigenze del caso speciale delle condizioni del mezzo in cui si trovano, o non svilupperanno affatto o si arresteranno precocemente nello sviluppo se non verranno aiutati diminuendo convenientemente la tensione dell'ossigeno esterno od in altro modo opportuno. E se questi tubi di cultura prima di venire seminati coi germi anaerobici si sono lasciati per un certo tempo in termostato al contatto dell'aria, e le poche sostanze nutritive eventualmente ancora disciolte hanno avuto così agio di modificarsi al contatto dell'ossigeno ed i poteri riducenti delle sostanze disciolte si sono nello stesso modo neutralizzati, lo sviluppo dei germi, anche dei più adattabili, non potrà iniziarsi od in modo insufficiente e la cultura non progredirà.

Io crederei ancora che per la interpretazione del fatto che alcune volte avviene lo sviluppo aerobico dei germi in tubi di brodo sterilizzati con tessuto o col coagulo albuminoso, o con glucosio, anche se seminati un tempo abbastanza lungo dopo che furono abbandonati al contatto dell'aria a temperatura ambiente, non sia da escludere da una parte la possibile influenza delle attività riducenti le quali, mentre si esplicano quasi insensibilmente a temperatura ambiente, si riattivano notevolmente coll'elevarsi della temperatura nel termostato, e dall'altra la possibilità che il germe stesso, il quale sarebbe ancora insufficiente da solo a vincere la fissità dell'ossigeno nelle molecole delle sostanze nutrienti disciolte nel substrato, vi può riuscire invece quando la coesione atomica dell'ossigeno nella molecola stessa, benchè non vinta, è però indebolita dalla influenza antagonistica esercitata ancora dalla sostanza riducente disciolta, benchè ormai resa debolmente attiva dal prolungato contatto coll'aria. E noi possiamo, a me sembra, se non fissare entro dei termini esattamente valutabili, almeno comprendere come le predette condizioni che possono ora favorire ora ostacolare questi scambi molecolari per rispetto all'ossigeno fisso, siano suscettibili a varie influenze che sono fra l'altro in dipendenza delle tante variabilità possibili e spesso indeterminabili nella composizione e nello stato molecolare di un substrato nutritivo; e noi

ne prenderemo ad es. brevemente in esame una più avanti a proposito della influenza che vi può esercitare una variazione anche piccola nel grado di alcalinità.

Per ora concludendo in seguito all'esame ed all'apprezzamento dei fatti fin qui esposti, a me sembra che in nessuno si trovi una opposizione alla interpretazione della condizione causale, direi *esterna*, del fenomeno della anaerobiosi batterica quale noi osserviamo nei nostri comuni mezzi artificiali di cultura. Con ciò però non è ancora affatto spiegata nella sua ultima essenza l'anaerobiosi. Ed io non oserei dire, ad es., in modo sicuro se l'ossigeno fissatosi alle sostanze nutritive rappresenti soltanto per il ricambio di questi germi un ostacolo da rimuoversi con mezzi opportuni e che può venire utilizzato invece dell'ossigeno atmosferico, oppure se questo ossigeno prima fissatosi e più o meno strettamente legato nel substrato, il quale presumibilmente si libera sotto l'azione dei germi, allo stato atomico, non rappresenti anche quello che solo può essere utilizzato per le ossidazioni necessarie alla vita dei germi stessi. E così pure non oserei per ora negare in modo sicuro che eventualmente fra aerobi ed anaerobi, per quanto almeno si riferisce alla tolleranza o meno per l'ossigeno dell'aria, non si tratti forse che di gradazioni nei loro interni poteri ossidativi e quindi nelle più o meno attive azioni riducenti che possono spiegare sulle sostanze nutritive del substrato, nelle quali inoltre l'ossigeno può trovarsi in un grado vario di fissità; ma che in entrambi i casi l'ossigeno direttamente utilizzabile per il ricambio sia sempre quello che essi trovano già più o meno strettamente fissato e già allo stato atomico nel substrato stesso; mentre per le ossidazioni necessarie alla vita di organismi superiori, sostanze intermedie, come ad es. l'emoglobina, fissando previamente dell'ossigeno, hanno forse anche la funzione di modificare in modo la disposizione degli atomi nella molecola da rendere poi facile la liberazione di ossigeno atomico e quindi chimicamente attivo.

E ritornando ora a quanto in queste ricerche può riferirsi alla praticità ed alla opportunità della preferenza da darsi quale mezzo nutritivo liquido per gli anaerobi, al brodo sterilizzato con tessuti animali, a me sembra risulti che tale mezzo potrà bensì realmente prestare un utile servizio nella tecnica batteriologica quando non si possa essere sicuri della asetticità del tessuto, ma quando altresì non si dimentichi che esso non si presta per tutti i germi anaerobici ugualmente bene come i substrati con tessuto non cotto, e che alcuni germi, e fra i più importanti dei patogeni, come il te-

tano, possono nella generalità dei casi non svilupparvisi o con molta incostanza e sempre in modo insufficiente.

Altri pericoli di nullità di riuscita e da evitarsi usando di tale modificazione, incontreremo nel corso delle seguenti ricerche.

II.

Scopo delle seguenti ricerche è di prendere in speciale considerazione e studiare con determinatezza alquanto maggiore di quanto non abbia fatto in precedenti lavori, la influenza che il vario grado di alcalinità del brodo può esercitare sull'esito delle culture fatte in tubi di brodo che siano stati previamente sterilizzati nell'autoclave. A tale proposito si era già antecedentemente rilevato come un maggior titolo di alcalinità del brodo glucosato avesse per effetto di favorire energicamente la azione riducente del glucosio, e quindi presumibilmente di facilitare fatti di ossidazione nel glucosio stesso. E di questa maggiore attività riducente del glucosio in tali condizioni me ne ero valso per indicare alcune norme secondo le quali si poteva preparare un brodo nel quale i germi anaerobici vi si potessero sviluppare facilmente anche in tubi aperti senza che fosse più necessaria la presenza nel liquido di cultura del tessuto animale. In tale brodo difatti, tutti i germi che io vi ho sperimentati crebbero rigogliosamente sempre e sporificarono bene. Solo il tetano vi poteva fare difetto sviluppandosi scarsamente ed arrestandosi alla forma vegetativa ⁽¹⁾. Era però già sufficiente solo chiudere con un tappo di gomma il tubo od il matraccio di cultura perchè lo sviluppo vi si compiesse più abbondante, benchè difettosa rimanesse però sempre la sporificazione. La tossicità della cultura si manteneva però in ogni caso sempre molto elevata. Ma già nel corso di quelle ricerche ed in altre fatte in seguito sui tessuti sterilizzati, mi ero accorto come la deficienza od anche la mancanza di sviluppo che in determinati casi osservavo, dovesse tenere ad un troppo elevato grado di alcalinità e come fosse in rapporto anche col grado di temperatura a cui i substrati troppo alcalinizzati venivano sottoposti.

D'altra parte poi io avevo potuto constatare come la sola presenza dell'alcali aggiunto a freddo anche in quantità rilevanti

(1) Appunti di tecnica per la cultura dei germi anaerob. R. Accademia dei fisiocr. 1906.

nel tubo di cultura contenente tessuto crudo non impedisse affatto lo sviluppo e la completa evoluzione dei germi. Del resto la tolleranza dei germi anaerobici ad un grado anche elevato di alcalinità del mezzo è già stata ripetutamente rilevata. In tubi contenenti 5 cc. di brodo ed un frammento di fegato crudo di cavia e nei quali aggiunti in alcuni 6, in altri 12 gocce di soluzione di carbonato sodico al 10 %, e poi seminati col tetano, carbonchio sintomatico e vibrione settico, ottenni per tutti questi germi sviluppo rigoglioso.

Già avevamo inoltre potuto vedere ⁽¹⁾ come riscaldando semplicemente a bagno-maria per 20 minuti dei tubi contenenti brodo glucosato a diverso grado di alcalinità si potesse ottenere sviluppo aerobico dei germi anaerobici solo in quelli in cui il tasso dell'alcali era più elevato. Ma se la sterilizzazione invece si faceva in autoclave, lo sviluppo si aveva invece nei tubi a minor grado di alcalinità ed era difettosa o poteva invece anche mancare affatto nei tubi a maggior grado di alcalinità. Ritorneremo più avanti più dettagliatamente su questi fenomeni. Per ora ci basti il rilevare come l'alcali in eccesso sotto l'azione di alte temperature nuocia alle condizioni del brodo per rapporto alle sue facoltà di dare sviluppo ai germi anaerobici. Interessante invece per noi sarebbe potere stabilire in qual modo l'alcali spieghi questa azione nociva.

Per tentare una risposta a questo quesito feci qualche osservazione.

Preparato del brodo neutro nel modo tante volte detto ⁽²⁾, ne feci due parti, nell'una delle quali aggiunti glucosio nella proporzione del 2 per 100. Entrambi i brodi distribuii in provette portando in ciascuna 10 cc. del liquido.

Cinque tubi per ciascuna serie lasciai neutri; in diversi altri gruppi, pure di cinque tubi per ciascuna serie, aggiunti 4, 8, 10, 14 gocce di soluzione di carbonato sodico, e li sterilizzai lasciandoli per 10 minuti a 120°. In uno dei tubi per ciascun gruppo aggiunti prima della sterilizzazione una goccia della solita soluzione di bleu di metile all'1 per 100. Dopo la sterilizzazione seminati due tubi di ciascun gruppo col tetano e due col carbonchio sintomatico; si chiusero tutti anaerobicamente mediante il pirogallato potassico, e, posti in termostato, vennero esaminati dopo due giorni.

(1) Osservaz. sulla natura dei fenom. che determinano la esigenza anaerobica ecc. R. Acc. dei fisiocritici - Siena, vol. XVII, 1905.

(2) Appunti di tecnica ecc. l. c.

I tubi lasciati neutri diedero sviluppo rigoglioso pei due germi tanto nel brodo semplice che in quello glucosato.

Dei tubi di brodo non glucosato, quelli con 4 gocce della soluzione alcalina diedero sviluppo discreto con scarsa formazione di spore per il carbonchio sintomatico, mentre rimasero sterili per il tetano; i tubi con 8, 10, 14 gocce di soluzione alcalina rimasero sterili anche per il carbonchio sintomatico.

Dei tubi di brodo glucosato furono positivi per il tetano e per il carbonchio sintomatico quelli con 4 gocce di soluzione alcalina. Il tetano dette ancora leggerissimo intorbidamento soltanto in quelle con 8 gocce.

Il carbonchio sintomatico diede ancora sviluppo in tutti i tubi a maggior grado di alcalinizzazione, ma scarso e senza sporificazione.

Nei tubi coloriti col bleu di metile, e che naturalmente si lasciarono in comunicazione coll'aria, si osservò che quelli neutri non glucosati, che quando si tolsero dall'autoclave erano interamente scoloriti, si ricolorivano prontamente al contatto dell'aria; quelli alcalini si ricolorivano con ritardo di qualche ora, e vario a seconda del grado di alcalinità; in termostato quelli maggiormente alcalinizzati riprendevano il colore fino negli strati più profondi solo verso il secondo giorno.

Nei tubi glucosati la scolorazione persisteva molto più a lungo, ed anche quelli neutri, messi in termostato, non si ricolorivano interamente che verso la fine del primo giorno. Quelli alcalinizzati persistevano nella scolorazione anche a temperatura ambiente, eccetto che negli strati superiori e si decoloravano completamente di nuovo dopo poco tempo se messi in termostato, e così si mantenevano per un tempo vario di due o tre giorni. Agitandoli fortemente poco dopo tolti dall'autoclave, riappariva il colore bleu, il quale però già a vista scompariva appena si lasciassero in riposo. Di fenomeni analoghi, che sono certamente dovuti ad energiche ossidazioni del glucosio, ho già ripetutamente avuto campo di parlare. Dobbiamo invece ora vedere quanto risulti da queste esperienze in merito alla influenza dell'alcali sulle condizioni del brodo.

Analizzando questi risultati, una prima constatazione da farsi è che il grado maggiore di alcalinità del brodo durante la sterilizzazione deve modificare siffattamente le condizioni del brodo stesso, in modo che si arriva anche con un grado non molto elevato di alcalinità, fino ad avere dei risultati completamente negativi anche coltivandovi i germi anaerobicamente.

Inoltre si verifica il fatto che il grado maggiore di alcalinità fa sentire la sua azione nociva assai più nei brodi semplici che nei glucosati.

Ma in quale modo l'alcali avrà agito alterando in tal modo le condizioni del brodo? Le ipotesi possibili sono, secondo me, specialmente due, e cioè si può ammettere o che si producano nel brodo sotto l'influenza del calore e dell'alcali delle sostanze per sè stesse nocive allo sviluppo regolare dei germi, o che semplicemente le sostanze nutritive del brodo si trasformino in modo sotto tali condizioni, da non potere più essere utilizzabili per i germi nemmeno facendo le culture anaerobicamente, senza però che per sè stesse influiscano dannosamente sullo sviluppo.

La prima ipotesi si può, io credo, eliminare facilmente inquantochè noi possiamo sempre constatare come basti introdurre in uno dei tubi alcalinizzati che rimasero sterili in condizioni anaerobiche anche dopo parecchi giorni di termostato, un pezzetto di organo crudo perchè il germe dia subito segno di sviluppo.

Resta dunque più probabile la seconda ipotesi, a proposito della quale noi dovremmo però ancora domandarci di che natura possano essere le modificazioni nocive allo sviluppo, che si producono nelle sostanze del brodo fortemente alcalinizzato e sottoposto ad elevate temperature. Possiamo cercare sui fatti sopra osservati di avvicinarci ad una interpretazione probabile.

Abbiamo sopra visto come nei tubi di brodo alcalinizzati e coloriti col bleu di metile ci fosse segnalata mediante la scolorazione del mezzo lo svolgersi in esso di energiche ossidazioni, le quali si continuavano ancora con notevole intensità quando i tubi erano già da diverso tempo stati estratti dall'autoclave. Se non è direttamente dimostrato, è però assai presumibile che con tali fenomeni di ossidazione siano soprattutto strettamente legate le modificazioni che avvengono nel substrato per cui diventa non più idoneo allo sviluppo dei germi. Ma noi non potremo dire per ciò se questa attiva fissazione di ossigeno che si osserva per parte delle sostanze contenute nel brodo siano contemporaneamente accompagnate o no da distruzioni o sdoppiamenti delle molecole delle sostanze nutritive che siano causa dello stabilirsi di condizioni improprie alla loro assimilazione, oppure se il mancato sviluppo che si osserva anche in condizioni anaerobiche abbia semplicemente la sua causa in una più forte ossidazione e fissazione di ossigeno nelle molecole stesse.

Da questa esperienza noi abbiamo ancora visto come risultasse

in modo evidente che la presenza del glucosio mitiga la influenza dannosa dell'alcali alle elevate temperature dell'autoclave, ciò che presumibilmente, io credo, è da mettersi in rapporto col fatto che il glucosio fissando per sè stesso molto attivamente l'ossigeno che si diffonde nel substrato, impedisce che questo venga fissato dalle sostanze proprie del brodo e può anche fino ad un certo punto appropriarsi di quello in esse già fissatosi. Ma la determinazione precisa del modo con cui avvengano questi fatti non è per noi ora ciò che più ci debba interessare.

Invece, constatato così per mezzo di queste osservazioni che l'alcali in eccesso durante la sterilizzazione può per sè stesso esercitare una azione nociva sopra lo sviluppo dei germi anche in brodi glucosati ed in culture fatte anaerobicamente, noi dobbiamo vedere come si comportino le culture in tubi di brodo glucosato, pure alcalinizzati in grado crescente, ma che, invece di venire chiusi anaerobicamente, si lascino al contatto dell'aria. Feci pertanto una altra serie di prove nella quale, i tubi di cultura, chiusi col solo tappo di cotone, venivano parimenti seminati coi germi anaerobici poco dopo tolti dall'autoclave, e dopo che si erano raffreddati.

In questa esperienza veniva distribuito in ragione di 5 cc. per ogni tubo di cultura, del brodo esattamente neutralizzato fino alla reazione anfotera e glucosato nelle solite proporzioni. Se ne facevano diversi gruppi di 4 tubi ciascuno e vi si aggiungeva nei diversi gruppi 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 gocce di soluzione di carbonato sodico al 10 %.

Questi tubi poi si sterilizzavano in autoclave a 115° circa, per 10 minuti.

Poichè il b. del tetano, come ebbi più volte a ripetere, dà in questi mezzi risultati difettosi e non uniformi, mi valse per queste esperienze soltanto del carbonchio sintomatico e del vibrione settico.

Esaminati questi tubi dopo due giorni di termostato si osservava che i tubi non alcalinizzati oltre alla reazione anfotera erano rimasti sterili. Il colore del brodo in questi casi non prende come negli altri il colore di caramello od ingiallisce appena sensibilmente.

In quelli a cui era stata aggiunta una goccia della soluzione alcalina si ebbe intorbidamento in un tubo solo di carbonchio sintomatico nel quale si constatò pure una buona sporificazione.

Nei tubi con 2, 4, 6 gocce di alcali si ebbe sviluppo e sporificazione in tutti quelli seminati col vibrione settico; rimasero limpidi invece quelli seminati col carbonchio sintomatico.

Nei tubi a cui furono aggiunte 8, 10, 12 gocce della soluzione alcalina si ebbe intorbidamento in tutti tanto per il carbonchio sintomatico che per il vibrione settico. Si notava però che nei tubi con 12 gocce di alcali lo sviluppo si era compiuto male, e specialmente per il carbonchio sintomatico non si aveva formazione di spore. Un difetto nello sviluppo e soprattutto nella sporificazione si osservava però già nei tubi a 10 e 12 gocce di alcali anche per il vibrione settico.

Risulta da questa esperienza che per lo sviluppo aerobico del carbonchio sintomatico nel nostro caso in brodi sterilizzati per 10 minuti a temperatura di autoclave non molto elevata e corrispondente approssimativamente a poco meno di una atmosfera, occorre che il brodo abbia un grado di alcalinità maggiore, e che quindi il glucosio vi eserciti un più energico potere riducente, che non per quelli del vibrione settico; un grado eccessivo di alcali nuoce però ad entrambi i germi forse nel modo e per le ragioni che più sopra furono esposte per la precedente esperienza.

Ora, se si confrontano i risultati di questa esperienza con quelli della precedente, emerge pure chiaro, mi pare, il fatto che la esigenza anaerobica in questi brodi glucosati e sterilizzati a temperature non elevate di autoclave, sia in certo modo in rapporto inverso col grado di alcalinità del brodo stesso, e cioè che col crescere del grado della alcalinità scompare la necessità dell'allontanamento dell'ossigeno atmosferico perchè si abbia lo sviluppo, poichè a debole grado di alcalinità ed a reazione neutra non si ebbe sviluppo che anaerobicamente. Però oltre un certo limite dell'alcalinità in tutti i casi i brodi diventano inetti allo sviluppo.

In un'altra esperienza furono nello stesso modo che nella precedente alcalinizzati con 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 gocce di soluzione di carbonato sodico varî gruppi di 7 tubi ciascuno di brodo glucosato, senonchè, invece di sterilizzarli nell'autoclave a circa 115' per 10 minuti, si sterilizzarono per lo stesso tempo ad una pressione fra 130-135° e cioè corrispondente approssimativamente a due atmosfere. In questo modo io supponevo che mentre avrei potuto evitare l'eccesso di alcali il quale determinava delle ossidazioni troppo rapide ed energiche nel brodo anche dopo che era stato tolto dall'autoclave e che era venuto in contatto coll'aria, eccesso di alcali, che, come sopra vedemmo, si era mostrato dannoso in queste condizioni allo sviluppo dei germi sia nelle culture anaerobiche che nelle aerobiche, si sarebbe però potuto ottenere lo scopo di rendere più attiva la azione disossidante del glucosio sulle so-

stanze del brodo mediante l'azione di temperature più elevate; e poichè nei tubi a minore grado di alcalinità le ossidazioni si mostravano dopo qualche ora che erano state tolte dall'autoclave più blande, io supponevo che nei tubi ad alcalinizzazione non molto elevata e più fortemente riscaldati, vi avrei potuto poi coltivare aerobicamente con effetti utili i germi anaerobici. Vedremo tra breve come la prova corrispose perfettamente, nei risultati almeno che se ne ottennero relativamente allo sviluppo dei germi, a queste induzioni.

In questa esperienza, prima della neutralizzazione del brodo-peptone non ancora filtrato, prelevai una certa quantità del brodo stesso, tanto da poterne fare 4-5 tubi, che non ho neutralizzato ed al quale aggiunsi glucosio pure in ragione del 2 %.

Per gli altri, filtrato il brodo neutralizzato, vi aggiunsi il glucosio e poi distribuii in tubi portando in ciascun tubo 5 cc. del brodo come per la esperienza precedente. Aggiunsi poi l'eccesso d'alcali nelle predette proporzioni e posi il tutto a sterilizzare nell'autoclave fino alla temperatura anzidetta, e dopo raffreddamento vi seminai i germi anaerobici.

Esaminate le culture dopo due giorni di incubazione in termostato l'esito fu che nei tubi non neutralizzati non si ebbe traccia di sviluppo. Essi avevano inoltre conservato inalterato il loro colore, mentre gli altri avevano più o meno, a seconda del grado di alcalinizzazione, assunto il colore di caramellizzazione.

In quelli a cui era stato aggiunto alcali fino a neutralizzazione completa, ed in quelli con 1, 2, 4 gocce di soluzione alcalina svilupparono e sporificarono regolarmente tanto il vibrione settico che il carbonchio sintomatico. In questi tubi, ma specialmente in quelli a cui erano state aggiunte 1 e 2 gocce di alcali, le culture erano ricchissime, intenso ed uniforme l'intorbidamento, e solo dopo qualche giorno si deponeva nel fondo del tubo un abbondante sedimento di bacilli e di spore.

Dei tubi con 6 gocce di alcali svilupparono soltanto quelli seminati col vibrione settico. Quelli con 8 e 12 gocce rimasero sterili.

Per cui confrontando l'esito delle culture di questa serie con quelli della serie precedente se ne deve dedurre che la temperatura più elevata di sterilizzazione ha bensì influito rendendo più dannosa l'azione dell'alcali sulle sostanze nutritive del brodo, ma in compenso si poté avere sviluppo rigoglioso ed evoluzione completa dei germi in tubi di brodo ad alcalinizzazione minore di quella della serie precedente.

Non credo inutile, a maggiore evidenza dei fatti sopra annunziati relativi alla influenza reciproca del grado di alcalinità e del grado della temperatura di sterilizzazione sopra i brodi glucosati per rispetto al loro potere di dare sviluppo aerobico ai germi anaerobici, di riprodurre uno accanto all'altro in uno specchio i risultati di queste ultime due serie di esperienze, a cui unisco anche quelli di una serie fatta con brodi glucosati, pure alcalinizzati in serie crescente, ma che invece di essere stati sterilizzati nell'autoclave, furono sottoposti per 20 minuti all'ebullizione a bagnomaria. L'esito positivo è segnato col segno +, quello negativo col segno 0.

Gocce di soluzione di Na_2CO_3 al 10 o/o agg. te al tubo di brodo	Bolliti a bagno - maria per 20 min.		Sterilizzati in autoclave per 10 min. a 115°		Sterilizzati in autoclave per 10 min. a circa 130°	
	C. S.	V. S.	C. S.	V. S.	C. S.	V. S.
0	0	0	0	0	+	+
1	0	+	+	0	+	+
2	0	0	0	+	+	+
4	0	0	0	+	+	+
6	0	0	0	+	0	+
8	0	+	+	+	0	0
10	+	+	+	+	0	0
12	+	+	+	+	0	0

Questa tavola compendia in certo modo altre prove che io avevo altra volta fatte nel cercare il grado più conveniente di alcalinità da darsi ad un brodo glucosato che potesse servire nell'uso pratico per la cultura aerobica di germi anaerobici. Difatti, volendo da una parte evitare un grado di alcalinità troppo elevato, il quale oltre a richiedere un riscaldamento a temperature troppo basse e per un tempo breve, ciò che porterebbe a due inconvenienti, perché facilmente potrebbe venire inavvertentemente superata la opportuna temperatura di sterilizzazione, alterandosi così le condizioni del brodo in modo da renderlo non più adatto allo sviluppo dei germi

e poi non garantirci in tutti i casi della perfetta sterilizzazione del mezzo, nuoce ancora sempre più o meno alla evoluzione regolare e completa dei germi; e d'altra parte volendo pure essere sicuri che il grado di alcalinità fosse in ogni caso sufficiente perchè si determinassero nel brodo glucosato le ossidazioni del glucosio e le conseguenti riduzioni nel modo più utile e conveniente perchè lo sviluppo dei germi vi si effettuasse nel miglior modo possibile, proposi di aggiungere nel brodo glucosato prima di distribuirlo nei tubi e della sterilizzazione, 2 cc. di soluzione di carbonato sodico al 10 % ogni 100 cc. di brodo, il che corrisponde appunto, calcolando approssimativamente un cc. di liquido avente ad un dipresso la densità del brodo, uguale a 20 gocce dello stesso liquido, al grado di alcalinità dei tubi dell'ultima serie nei quali per 5 cc. di brodo si erano aggiunte due gocce della soluzione alcalina.

Tale grado di alcalinità si mostrava anche il più conveniente poichè, come risulta dallo specchio dell'ultima serie di culture, in cui il brodo fu riscaldato a circa due atmosfere, esso si trova come al centro di un margine di oscillazioni in più od in meno entro ai quali è ancora sempre sicura la riuscita delle culture. Per mia esperienza però devo avvertire che è sempre conveniente por mente a che non venga superata, mentre è indifferente, specialmente sterilizzando a temperature così elevate, anche tenersi ad un grado di alcalinità alquanto minore. Del resto un buon indice noi abbiamo nel calore assunto dal brodo, il quale deve essere di un bel colore giallo d'oro carico. Nei tubi troppo alcalinizzati o soverchiamente riscaldati il colore diventa invece molto più intenso e scuro.

In questi brodi lo sviluppo dei germi oltre ad essere costante è sempre molto denso e rigoglioso ed abbondante la sporificazione. Inoltre in questo brodo, come a suo luogo già dissi, io provai con risultato ugualmente buono tutte le specie di anaerobi di cui disponevo, ad eccezione che per il b. del tetano.

Dalla suesposta tabella non potrebbe riuscire più evidente la influenza esercitata dal diverso grado di temperatura di sterilizzazione e dell'alcalinità del brodo sopra le modificazioni che in presenza del glucosio si determinano nel brodo stesso in riguardo allo sviluppo aerobico dei germi anaerobici. Noi vediamo è vero qualche risultato positivo isolato fra le serie di quelli negativi, come per i tubi che furono scaldati a bagno-maria, ove si ottenne una buona cultura in un tubo alcalinizzato con una sola goccia di carbonato sodico, e così pure in quelli riscaldati a circa 115° tro-

viamo un esito positivo per il carbonchio sintomatico in un tubo parimenti a debole grado di alcalinità; ma questi risultati così isolati non possono nulla togliere al significato così evidente dei risultati complessivi delle esperienze; e d'altra parte è difficile il potere esattamente valutare per quale condizione di fatti, forse anche accidentale, passata inosservata in un tubo isolato, i fenomeni relativi alle reazioni ed ai rapporti chimici fra le sostanze del brodo, abbiano potuto anche leggermente deviare da quelli che si osservano come regola nella generalità degli altri.

È anche naturale che si possano osservare oscillazioni anche non piccole fra esperienza ed esperienza poichè non è possibile valutare esattamente nei singoli casi i diversi fattori che possono influire nel determinarli (durata della sterilizzazione e tempo necessario per portare i substrati al grado voluto di temperatura, condizioni speciali inerenti al brodo e non determinabili ecc.) e si può a volte osservare compiersi bene lo sviluppo in tubi ad un grado molto basso di alcalinità e sterilizzati anche ad una sola atmosfera; ma nelle sue linee principali il fatto però non varia.

Come più sopra dissi, il tetano solo si mostrò sempre incerto ed irregolare nel suo sviluppo in questi brodi, perciò non me ne sono valso per queste ricerche sistematiche. Però, ripeto, nei tubi contenenti brodo glucosato al grado di alcalinizzazione e preparato come sopra ho indicato, un leggiero intorbidamento del brodo, molto vario nella sua intensità, si può dire costante; e se si ha solo cura di chiudere ermeticamente con un tappo di gomma la provetta, o meglio ancora, il matraccio di cultura, si ottiene sempre anche per il tetano uno sviluppo buono ed in ogni caso sufficiente per fornire una tossina molto attiva. Solo eccezionalmente però si può in questi brodi ottenere per questo germe sporificazione, o sempre difettosa e scarsa.

In una prova appositamente fatta io diluii rispettivamente un'ansa di cultura contenente molte spore di carbonchio sintomatico e di vibrione settico in tubi di brodo, e di tali diluizioni semina i qualche ansa in tubi glucosati ed alcalini preparati come sopra ho detto, e si ebbe sviluppo completo delle culture; ciò che prova che anche spore isolate od in scarso numero possono svilupparsi bene. Del resto noi abbiamo già avuto occasione di constatare come nei substrati solidi di agar, preparati con identici criterii, sviluppassero assai bene le colonie isolate dei germi anaerobici.

Non credo ora di dovermi di nuovo soffermare sulla interpretazione dei fatti che ho esposto relativi a queste esperienze.

Per parte mia non esiterei anche qui ad ammettere come la interpretazione più plausibile e forse la sola razionalmente possibile ed in opposizione netta con nessuno dei fatti osservati, sia quella secondo cui il glucosio in questi casi coadiuvi i germi nella azione riducente che essi devono compiere per distaccare l'ossigeno fissatosi nelle sostanze ossidate nel substrato nutritivo.

* * *

Le seguenti poche osservazioni sono state rivolte a ricercare quale influenza possa esercitare sulla riuscita della cultura dei germi anaerobici in tubi di brodo sterilizzati con un pezzo di tessuto parenchimale, il diverso grado di alcalinità del mezzo. Ciò oltre a darci campo per opportuni raffronti con quanto si osserva a tale proposito nei tubi glucosati, ci potrà anche far conoscere per riguardo all'uso pratico del metodo, in qual modo si possa facilmente incorrere nel pericolo di vedere mancare il risultato della cultura, e come si debba in tal caso evitare.

In una serie di tubi distribuii del brodo-peptone neutro versando 10 cc. del liquido per ciascun tubo.

Nel preparare il brodo ne avevo prelevata una piccola quantità prima della neutralizzazione e, dopo la filtrazione, si era distribuito in tubi come il precedente. In ciascuno di questi si è poi introdotto un pezzo di fegato di coniglio del peso approssimativo di circa 1,5-2 grammi, e se ne fecero diversi gruppi di 7 tubi ciascuno, e cioè sette non neutralizzati, sette che si lasciarono neutri, altri sette dei neutri a cui si aggiunsero poi 4 gocce per ciascuno della solita soluzione alcalina, e sette degli stessi a cui si aggiunsero invece 8 gocce della stessa soluzione. In uno dei tubi di ciascun gruppo si introdusse come indicatore una goccia di soluzione di bleu di metile, e si portarono tutti nell'autoclave già in ebullizione, e si sterilizzarono per 10 minuti alla temperatura di circa 120°.

Quando si tolsero dall'autoclave i tubi non neutralizzati e quelli neutri avevano conservato il colore naturale del brodo e vi si vedevano i coaguli delle albumine che vi si erano diffuse dal tessuto. I tubi alcalini avevano assunto un colorito o leggermente o più intensamente oscuro a seconda del grado dell'alcalinità ed i coaguli albuminosi vi si erano interamente disciolti.

Dopo che si furono raffreddati si seminò di ciascun gruppo un tubo col tetano, un altro col carbonchio sintomatico. Altri due tubi

uno per ciascun germe, se seminarono dopo 12 ore, altri dopo due giorni dalla sterilizzazione. Per maggiore comodità mi sono valso per questa osservazione solo di due germi dei quali uno, il tetano, rappresenta quello che più difficilmente si adatta a questo genere di culture, l'altro rappresenta invece la serie di tutti gli altri più facilmente coltivabili.

I tubi seminati vennero rispettivamente esaminati dopo due giorni di incubazione in termostato a 37° , e si ebbero i risultati seguenti: Dei tubi non neutralizzati e dei neutri si erano uniformemente intorbidati quelli seminati col carbonchio sintomatico; erano rimasti apparentemente chiari quelli seminati col tetano. Al microscopio si rilevò sviluppo buono e sporificazione per il carbonchio sintomatico; nei tubi di tetano si vedeva, se esaminati in goccia pendente, solo qualche rara forma bacillare. Risultati pressochè analoghi si ottennero, per questi tubi non neutralizzati e neutri, sia in quelli seminati dopo 12 ore che dopo due giorni dalla sterilizzazione.

Dei tubi alcalinizzati, in quelli seminati subito e 12 ore dopo la sterilizzazione si osservava scarso sviluppo di sole forme bacillari per il carbonchio sintomatico; nelle culture corrispondenti del tetano, rimaste perfettamente limpide, non si incontrava in goccia pendente che qualche rara forma bacillare. In quelli seminati dopo due giorni dalla sterilizzazione non si vedeva traccia di sviluppo nei tubi alcalinizzati con 8 gocce di soluzione alcalina; rare forme bacillari invece si osservavano per il carbonchio sintomatico nei tubi alcalinizzati con 4 gocce.

Una analoga esperienza ho ripetuto aggiungendo al brodo non più pezzi di fegato, ma di rene, e ciò feci allo scopo di vedere se la eventuale presenza di una maggiore quantità di glicogene, come si poteva avere nel fegato, avesse potuto avere una certa influenza sull'esito positivo delle culture nei tubi alcalinizzati. Ori ⁽¹⁾ già lo aveva potuto escludere per le culture fatte in presenza di fegato crudo. Ma nei tubi riscaldati con tessuto, e tantopiù se alcalinizzati, le condizioni potevano cambiare, poichè il glicogene in reazione alcalina del mezzo avrebbe potuto sdoppiarsi, ed ossidandosi agire come riducente nello stesso modo che abbiamo visto avvenire per il lattosio ⁽²⁾. I risultati furono che nei tubi di brodo che

(1) Ori. — Sulla cultura degli anaerobii. Rivista d'igiene e sanità pubblica. Anno XVII, 1906.

(2) Osservazioni sulla natura dei fenomeni che determinano la anaerobiosi l. c.

non erano stati neutralizzati, ed in quelli esattamente neutri, si ebbe, come al solito, sviluppo buono per il carbonchio sintomatico e deficiente o mancante per il tetano. Ma dei tubi di brodo a cui era stato aggiunto l'alcali, solo in alcuni di quelli a cui si erano aggiunte 4 gocce della soluzione alcalina si ebbe leggiero intorbidamento, mentre altri rimasero apparentemente sterili. Al microscopio non si vedevano che forme vegetative, molte delle quali granulose per fatti degenerativi. I tubi poi a cui erano state aggiunte 8 gocce dell'alcali rimasero tutti sterili.

Una differenza fra l'esito di queste culture in tubi alcalinizzati in eccesso e sterilizzati in presenza di fegato e di rene, risulterebbe quindi da questa esperienza evidente, ed è affatto probabile che essa possa tenere ad un contenuto maggiore di sostanze riducenti non albuminose per parte del fegato, le quali avendo più affinità per l'ossigeno, in certo modo ostacolavano la ossidazione delle sostanze nutritive albuminose; ma in ogni modo l'azione di tali sostanze riducenti è sempre assai debole e presto neutralizzata dal diffondersi nel liquido dell'ossigeno dell'aria. Difatti vedemmo or ora come i tubi di brodo con fegato e sterilizzati, perdessero già moltissimo della loro attitudine a dare sviluppo aerobico ai germi anaerobici ad un grado di alcalinizzazione che nei brodi glucosati era invece il più adatto ad ottenere lo scopo.

Nei tubi coloriti col bleu di metile noi rileviamo fatti che quasi interamente si assomigliano a quelli che si osservano nei brodi glucosati, e cioè che essi sono variamente energici secondo il grado di alcalinità. Sono debolissimi nei brodi acidi e nei neutri tantochè essi appena tolti dall'autoclave quasi immediatamente si ricolorano, mentre nei tubi alcalinizzati la scolorazione permane per un tempo abbastanza lungo anche a freddo, e se si fanno ricolorire agitandoli, si decolorano presto lasciandoli di nuovo a riposo, e tanto più attive si manifestano le ossidazioni se si tengano in termostato. Ora le condizioni interne, per rispetto all'ossigeno disciolto, sono perfettamente uguali fra questi tubi e quelli glucosati, e cioè non vi devono presumibilmente esistere tracce di ossigeno libero; ma i germi nei primi non si sviluppano o male, mentre li abbiamo visti crescere benissimo nei secondi. La ragione di ciò, io credo, va cercata nel fatto che l'ossigeno viene fissato nei brodi alcalini con tessuto soprattutto dalle sostanze albuminose, poichè manca in questi casi la azione antagonistica più energica del glucosio.

E se noi vediamo nei brodi sterilizzati con tessuto che furono

esattamente neutralizzati, od anche in quelli nei quali la reazione fu lasciata a quel leggiero grado di acidità che si produce nella cottura dell'estratto di carne, avvenire lo sviluppo aerobico dei germi anaerobici, mentre nei brodi glucosati era quasi indispensabile un leggiero grado, ma deciso di alcalinità, questo fatto può trovare la sua spiegazione in quanto ho antecedentemente detto sui fenomeni che si svolgono nei tubi glucosati e nella interpretazione che abbiamo data del modo con cui il glucosio spiega la sua azione favorente e sulle condizioni invece delle albumine semplicemente precipitate dal calore, per cui mi dispenso da ripetizioni.

E se ora, per il lato pratico, noi consideriamo da una parte la influenza che un maggior grado della temperatura di sterilizzazione ed il tempo in cui il brodo vi rimane sottoposto, hanno nel favorire in ambiente alcalino le predette trasformazioni delle sostanze contenute nel brodo e nel tessuto aggiunto; e d'altra parte quanto sia facile nella preparazione dei substrati eccedere sia nel grado e durata del riscaldamento, come nella esatta valutazione della neutralizzazione del brodo, vedremo avanti a noi altri due pericoli che si dovranno evitare e per i quali si potranno avere esiti non buoni od anche negativi nella riuscita delle culture in brodi con tessuto e sterilizzati. Per cui in tali casi, di fronte ad un esito negativo, oltre al dubbio già sopra rilevato che si potesse avere a che fare con un germe che come il tetano, offra difficoltà spesso grandissime od insuperabili a svilupparsi aerobicamente in tali mezzi, ci si presenterà anche quello che uno dei predetti difetti, in cui si sia inavvertentemente incorso nella preparazione del substrato di cultura, possa fare mancare la riuscita anche per altri germi anaerobici; e questi dubbi soprattutto bisogna eliminare nel miglior modo possibile in quelle ricerche in cui non si sa con quali germi anaerobici si possa eventualmente avere a che fare.

A me sembra poi dall'insieme dei fatti esposti in questa seconda parte di queste ricerche, che ne venga sempre più suffragato il concetto che la anaerobiosi batterica sia strettamente e forse anche unicamente dipendente da modificazioni ossidative che hanno subite le sostanze nutritive a loro proprie provenienti in massima parte dalle cellule dei tessuti, le quali modificazioni rendono più difficile il separarsi dell'ossigeno fisso, come è invece necessario avvenga perchè possa effettuarsi l'assimilazione e la nutrizione dei germi.

Vi sono tuttavia alcune eccezioni o differenze nella facoltà che hanno i tessuti animali di permettere lo sviluppo aerobico dei germi

anaerobici, già altre volte ricordate, e delle quali è difficile darne una ragione su fatti dimostrativi. Abbiamo visto cioè come i tessuti più adatti per queste culture siano in generale gli organi parenchimali, fegato, rene, milza ecc.), mentre vi sono poco adatti alcuni altri, (tendini, tessuto fibroso, adiposo ecc.). Il tessuto muscolare stesso ed il cervello vi sono assai meno adatti del fegato, ad es. e del rene.

La varia resistenza del resto dei vari organi alla putrefazione non è che la espressione di questo fatto. Poco o punto adatti allo sviluppo degli anaerobi si è pure visto essere molti liquidi organici (transudati, siero, albume d'ovo ecc.), fatti che furono da altri confermati. Si può osservare che questi tessuti o liquidi in genere contengono poche cellule o poca sostanza protoplasmatica diffusibile ed utilizzabile dai germi. Facendo culture in tubi contenenti acqua e nei quali sia stata asetticamente introdotta una quantità anche relativamente grande di polpa cerebrale, si nota che lo sviluppo, benchè sia positivo, è sempre però assai più povero che non in tubi in cui sia stato aggiunto un frammento, ad es., di fegato. Per il b. del tetano anche in tubi di brodo con cervello lo sviluppo è molto povero e lento; in quelli con acqua e seminati con tetano, nei primi giorni di termostato, dall'osservazione esterna almeno, sembra non vi sia alcun movimento vegetativo. In un modo complessivo si potrebbe quasi affermare che diminuisce tale facoltà nei tessuti quanto più essi sono costituiti non più prevalentemente di cellule, ma di prodotti esterni di elaborazione cellulare, siano essi differenziati o no.

È vero che secondo Wrzosek anche col bianco d'ovo aggiunto a tubi di brodi e poi sterilizzati, si otterrebbero risultati sempre positivi; ma questo Autore sottoponeva prima i tubi col bianco d'ovo a sterilizzazione in autoclave, e non ha tenuto conto delle quantità rilevanti di sostanze energicamente riducenti che sono normalmente contenute nel bianco d'ovo e che possono in questi casi sostituirsi all'azione del glucosio nei comuni brodi glucosati determinando nei brodi condizioni opportune allo sviluppo aerobico dei germi, specialmente se vengono seminati subito dopo la sterilizzazione.

Ma allo stato crudo il bianco d'ovo aggiunto al brodo, come ha anche Ori visto con ricerche in proposito, non influisce sullo sviluppo, e le culture rimangono sterili. Alquanto diversamente invece a tale riguardo sembra si comporti il rosso d'ovo.

Quale sia la ragione intima di questo fatto non saprei dire; se sia dipendente da scarsa quantità di succo protoplasmatico solubile o da qualche differenza di costituzione che a noi ancora sfugga. Io ho potuto solo osservare che il tessuto cerebrale, ad es., possiede in molto minor grado di altri organi parenchimali, ad es. il tessuto epatico, la proprietà di fissare ossigeno dall'ambiente. Basta introdurre in due tubi di brodo o di acqua leggermente alcalina ed anche neutra, colorita con una goccia di bleu di metile, un frammento di fegato nell'uno e di sostanza cerebrale nell'altro, e poi porli in termostato, per osservare che nel tubo contenente il tessuto epatico il liquido si scolora per un buon tratto al disopra della superficie superiore del tessuto aggiunto, e così si mantiene anche diversi giorni, mentre nel tubo contenente sostanza cerebrale, la superficie superiore si mantiene ancora tinta del colore bleu, e dello stesso colore rimane tutta la colonna liquida soprastante. Che dello scarso e lento sviluppo dei germi in presenza di sostanza cerebrale possa essere causa per sè stesso soltanto questo debole potere di riduzione, non credo per le ragioni e gli esempi in contrario tante volte addotti nel corso di queste e di precedenti ricerche. Basterebbe a provarlo anche in questo caso speciale il fatto che lo sviluppo dei germi non è che manchi, ma è soltanto più povero e più lento, e progredisce fino alla sporificazione non solo nelle culture in brodo ma anche in quelle fatte semplicemente in acqua. Ora ciò non dovrebbe avvenire se lo sviluppo fosse in rapporto soltanto con la azione riducente spiegata dal tessuto, poichè tale azione diminuisce sempre più e va scomparendo colla permanenza del tessuto al contatto dell'aria. Ed è poi curioso il fatto che se uno di questi tubi con cervello ed acqua e seminato col tetano si chiude anaerobicamente, non per questo se ne ha sviluppo migliore, che anzi la cultura riesce nel più dei casi anche più tardiva e più misera. E non è il caso parlare, credo, di sostanze nocive eventualmente presenti nella sostanza cerebrale, perchè anche qui basta che si aggiunga un piccolo frammento di un tessuto qualunque parenchimale alla cultura perchè si determini subito ricco sviluppo del germe. Deve dunque presumibilmente ricercarsene la ragione in un particolare stato chimico delle sostanze di cui prevalentemente questi tessuti sono costituiti, stato che è diverso da quello delle sostanze di cui sono invece prevalentemente formati i tessuti parenchimali molto ricchi di cellule, e di cui difficile è determinare la natura se non per semplici ipotesi basate sulla considerazione di analogie possibili a trovarsi tra questi fatti e quelli

che si osservano in tubi di brodo sterilizzati e di cui ci siamo più sopra ed in precedenti lavori occupati.

Prima di por termine a questo mio lavoro voglio ancora prendere brevemente in esame quanto può osservarsi relativamente allo sviluppo dei germi anaerobici in tubi di brodo se noi, invece che sterilizzarli in autoclave con un pezzo di tessuto parenchimatoso animale, li sterilizziamo in presenza di alcuni tessuti vegetali.

Ori ⁽¹⁾ già aveva riconosciuto che lo sviluppo dei germi si poteva ottenere aggiungendo nei tubi di brodo prima di seminarli dei pezzi di tuberi di patata crudi e sterilmente prelevati. Altri vegetali invece, specialmente polpe di frutta, non avrebbero avuto tale proprietà. Questi fatti relativi allo sviluppo in presenza di pezzi di tuberi di patate io avevo poi confermati, ed avevo visto altresì che altri vegetali, come cotiledoni di leguminose verdi, se aggiunte al brodo parimenti favorivano lo sviluppo dei germi anaerobici. Le culture però rimanevano in ogni caso sempre più misere e stentate che non in presenza di tessuti animali crudi, e non riuscivano poi se si trovavano i germi a doversi sviluppare in immediato contatto dell'aria, come ad es. nel liquido di condensazione dell'agar inclinato. Questa facoltà poi svaniva ben presto con la permanenza del brodo in contatto coll'aria.

La interpretazione probabile che io davo per questi fatti era che delle sostanze ad azione riducente, di cui se ne poteva sempre constatare la presenza, e contenute in tali tessuti, potessero coadiuvare il germe nel compiere le riduzioni necessarie al suo sviluppo nelle sostanze nutritive del brodo. Si era però visto che anche in acqua semplice, quando però il tessuto aggiunto fosse relativamente abbondante in rapporto alla quantità del liquido eccipiente, lo sviluppo, per alcuni germi almeno, (vibrione settico, carbonchio sintomatico), si poteva pure avere, benchè sempre relativamente povero e non completo. Onde ne argomentavo che anche nei tessuti vegetali aggiunti potessero esservi sostanze nutritive, per quanto in piccola quantità in confronto dei tessuti animali, ma in condizioni tali da poter servire alla diretta assimilazione dei germi.

Wrzosek constatò il fatto interessante, fatto che del resto aveva già visto anche Ori riscaldando i tubi per 10' a bagno-maria, che

(1) Ori. — Sulla cultura degli anaerobi. 1.^a Nota. R. Acc. dei Fisiocritici, Siena, 1905.

se si aggiunge a dei tubi di brodo neutro un frammento di tubero di patata, il quale sia però abbastanza voluminoso, e si seminano dopo sterilizzazione, si ha in questi tubi buono sviluppo aerobico degli anaerobi. Anche per queste osservazioni però non si valse del b. del tetano. Se però invece del brodo, si pone acqua nei tubi, questi restano limpidi ed apparentemente sterili, ed all'esame microscopico soltanto si possono osservare nel liquido molto rare forme vegetative. Ho ripetute anch'io queste osservazioni, ed ho potuto constatare che realmente in simili mezzi culturali si manifesta una chiara azione favorente. Però il tetano vi fa anche qui eccezione perché o non si sviluppa o si arresta alla forma vegetativa. Interessante, ripeto, ci si presenta questa osservazione perché in questo caso si avrebbe apparentemente un comportamento diverso da quello che si osserva coi tessuti animali, dove invece lo sviluppo costante e sempre rigoglioso si ha quando non si sottoponga il tessuto alla sterilizzazione.

A me sembra però che a spiegare questo speciale comportamento possano senza difficoltà applicarsi gli stessi argomenti ed interpretazioni che si sono fatte a proposito dei tubi riscaldati col tessuto e col glucosio. Agirebbe cioè in questo caso il tessuto vegetale come una sostanza riducente, e quindi avrebbe la sua maggiore attività quando sia riscaldato in presenza della sostanza da ridursi. E che anche in simili casi si tratti solo di influenze le quali facilitano al germe la dislocazione dell'ossigeno fisso nelle sostanze nutritive, e cioè dell'azione di sostanze riducenti, mi pare si possa desumere ancora dalle osservazioni seguenti.

In una serie di tubi di calibro uguale si posero in alcuni 5 cc. di brodo neutro, in altri 10 cc.; si aggiunse in ciascun tubo un pezzo di tubero di patata, approssimativamente della stessa grandezza, e si sterilizzarono in autoclave per 15 minuti a 120°. Tolti dall'autoclave si portarono in termostato e vi si lasciarono per 2 giorni, dopo il qual tempo si seminarono tanto nei tubi contenenti 10 cc. di brodo, come in quelli che ne contenevano solo 5 cc., il carbonchio sintomatico ed il vibrione settico e li riposi in termostato. Esaminati dopo due giorni di incubazione osservavo che i tubi contenenti solo 5 cc. di brodo, nonostante che il pezzo di tessuto vegetale aggiunto fosse in tutti approssimativamente uguale, erano rimasti sterili, mentre avevano dato esito positivo tutti quelli con 10 cc. di brodo. È chiaro, mi sembra, che questa differenza deve dipendere dal fatto che l'azione neutralizzante dell'ossigeno atmosferico sulle sostanze riducenti contenute nel brodo e prove-

nienti dal tessuto aggiunto, doveva essere stata più tardiva nei tubi in cui era più alta la colonna di liquido.

Noi possiamo inoltre facilmente constatare come in questi tubi di brodo con tubero di patata si esplichino delle forti azioni riducenti dopo la sterilizzazione e che si riattivano notevolmente quando dopo il raffreddamento, si portino alla temperatura del termostato. Infatti uno di questi tubi di brodo che sia, al solito, stato colorito con una goccia di bleu di metile, e che, come sempre avviene, durante la sterilizzazione nell'autoclave si sia interamente decolorato, se viene posto in termostato quando, colla permanenza all'ambiente, abbia ripreso il colore, si decolora di nuovo fino agli strati più superficiali, per ricolorirsi lentamente solo dopo due o tre giorni di termostato. Nei tubi a reazione neutra però o leggerissimamente alcalina, quando siano lasciati dopo la sterilizzazione alla temperatura ambiente, questo potere riducente, che si rinvigorisce colla temperatura del termostato, non si esaurisce che assai più lentamente, e quindi può ancora esservi possibile lo sviluppo aerobico dei germi dopo un periodo vario di tempo dalla sterilizzazione, che, secondo quanto risultò anche al Wrzosek, può estendersi fino a 15 giorni. Ma in generale esso si esaurisce prima, e quanto più ci si allontana dal momento della sterilizzazione gli esiti delle culture si fanno sempre più malsicuri ed incompleti.

È ancora da notarsi che anche per questi brodi con tessuti vegetali, un eccesso anche non rilevante nella alcalinizzazione, mentre è causa che si producano nel mezzo più rapide ed energiche ossidazioni, facilmente rende questi substrati inadatti allo sviluppo dei germi anaerobici, ripetendosi per questi ad un dipresso gli stessi fatti che abbiamo visto a proposito dei tessuti animali, e tale potere, come risultò da una serie di prove fatte in proposito, scompare anche in questi casi prima nei tubi nei quali lo strato di liquido sia più basso.

Per le predette osservazioni a me sembrerebbe di potere spiegare lo sviluppo aerobico dei germi anaerobici nei brodi sterilizzati in presenza di un pezzo dei predetti tuberi vegetali, e quindi anche presumibilmente con altri vegetali, ammettendo che delle sostanze contenute in tali tessuti, in seguito all'azione del calore di sterilizzazione agevolino i processi di riduzione nelle sostanze nutritive del substrato e che quindi la loro azione favorente sia in certo modo paragonabile a quella spiegata dal glucosio nei brodi glucosati.

E concludendo, per quanto può riferirsi alla opportunità pra-

tica di valersi per le culture dei germi anaerobici di brodi sterilizzati con un frammento di tessuto parenchimale animale o vegetale, a me risulterebbe dalle suesposte osservazioni che tali mezzi potranno realmente riuscire utili in molte eventualità della pratica per comodità di preparazione dei substrati e soprattutto perchè ci garantiscono della loro sterilità facendoci evitare la rigorosa applicazione delle norme dell'asepsi nel prelevare il tessuto dall'animale; ma che essi non possono però ancora essere proposti nella generalità dei casi come sostituibili al metodo primitivo della cultura sopra tessuto parenchimatoso di organo animale al suo stato naturale, anzitutto perchè non sono estensibile in modo sicuro a tutte le specie più note dei germi anaerobici, e poi perchè sono soggetti a facili e varie cause di nullità di riuscita anche per i germi che sono meno difficilmente adattabili allo sviluppo aerobico. E volendo solo evitare la cura della applicazione delle norme di asepsi nel prelevamento del tessuto fresco o la evenienza possibile che si trattasse di un animale già infetto, potranno bensì tali mezzi sterilizzati riuscire in determinati casi, come si è detto, realmente utili, ma essi non presentano, secondo la mia esperienza almeno, vantaggi evidenti e decisi per essere preferiti ai brodi glucosati alcalini preparati secondo quanto sopra ed in precedenti lavori fu esposto.

Cagliari, Luglio 1907.

Era già terminato questo lavoro quando ho viste pubblicate sullo stesso argomento ricerche di Pfuhl (Centralbl. f. Batt. Orig. B. XLIV. H. 4 1907), Liefmann (Munch. med. Woch. 1907, n. 17), ed affatto recentemente di Wrzoseck (Centr. f. Batt. Orig. B. XLIV, n. 6). Del resto questi lavori non contengono alcun fatto nuovo molto importante per la quistione che ci ha fin qui occupati, e la massima parte dei fatti riferiti trovano il loro corrispondente o per

strette analogie o addirittura per identità nei lavori già molto tempo innanzi pubblicati in italiano da me, da Ori, da Bandini, e dei quali i predetti AA. non sembra se ne preoccupino più che tanto.

Sono invece, specialmente nell'ultimo lavoro sopracitato dello Wrzosek, con cura ricercati tutti i minimi dati di osservazione, benchè qualcunaltro sia nonostante a questo A. sfuggito, che si potessero ritrovare nella antecedente letteratura, e che si potessero riferire alla quistione dello sviluppo aerobico dei germi anaerobici. Come può già risultare da quella succinta rassegna, ma come meglio ancora apparirà se si vorrà riscontrare tali osservazioni nei lavori originali, esse si riferiscono a fatti isolati, per lo più casuali, non spiegati, ed a cui i rispettivi AA. non dettero speciale importanza e ritennero invece nei singoli casi da attribuirsi a proprietà non strettamente anaerobiche dei germi su cui venivano osservati (Kitt). Per questo non ho avuto opportunità in seguito di ricordarle in modo speciale nell' esporre i risultati delle mie osservazioni. Così pure Hibler (Centralb. f. Batt. 1899), che aveva ripetuta con successo la coltivazione del b. del tetano nel sangue di coniglio ed aveva pure in questo liquido coltivati altri germi anaerobici, per quanto avesse poi visto in una poltiglia di cervello umano ed acqua, che poi sterilizzava cocendola per mezz'ora, alcuni germi anaerobici seminativi per infissione svilupparsi non solo negli strati profondi, ma anche nei superficiali, sembra però fosse ben lontano nemmeno dal sospettare quanto gli vorrebbe attribuire Wrzosek poichè nello stesso lavoro, poco più avanti, dovendo coltivare il b. del tetano dalla milza e dal cervello di animali seminando grossi pezzi di detti organi, aveva cura di fare le culture in condizioni strettamente anaerobiche in ambiente di CO_2 o di H_2 .

Quanto alle più recenti osservazioni di Smith io non ho potuto ancora conoscere il lavoro originale dal quale risulterebbe che l'A., secondo Wrzosek, avrebbe coltivato in tubi da fermentazione (Gährungskolbchen) contenenti brodo con un pezzo di fegato, rene, milza di coniglio o cavla, ed in presenza dell'aria, il b. del tetano, il carbonchio sintomatico, l'edema maligno, ed altri anaerobi non ancora descritti; ma, stando al modo stesso col quale presenta la indicazione bibliografica lo Wrzosek (Smith Th, Brown H. R., Walther E. S.: The fermentation tube in the study of anaërobic bacteria with special reference to gas production and the use of milk as a culture medium. *The Journal of Med. Research*, V. XV n. 1 november. Boston, 1905, e Smith Th: Ueber einige Kultur-

merkmale des Rauschbrandbacillus. *Zeitsch. f. Inf-Kran, parasitäre krankheiten u. Hyg. d. Haustere* B. I. H. 1), queste affermazioni risulterebbero apparse nel novembre del 1905, ossia, come anche il primo lavoro dello Wrzosek, circa un anno dopo la mia prima pubblicazione (dicembre 1904) e molti mesi dopo le successive (marzo-maggio 1905).
